

Kokeellisen sydänlihasiskemian asteen määrittäminen histologisesti

Tatu Soininen

Syventävien opintojen opinnäyte

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Cardiac Research Group in Tampere

Tammikuu 2017

Tampereen yliopisto

Lääketieteen yksikkö

Cardiac Research Group in Tampere

TATU SOININEN: KOKEELLISEN SYDÄNLIHASISKEMIAN ASTEEN MÄÄRITTÄMINEN HISTOLOGISESTI

Kirjallinen työ, 13 s.

Ohjaaja: dosentti Ari Mennander ja professori Timo Paavonen

Tammikuu 2017

Avainsanat: sydämen hapenpuute, sydämen äkillinen vajaatoiminta, rotan sydänmalli

Tiivistelmä

Johdanto: Sydänkirurgiassa käytetään hallittua hapenpuutetta leikkausten aikana. Sydän on elimenä kuitenkin herkkä hapenpuutteen aiheuttamille vaurioille. Hapenpuutteen ja iskemia-reperfuusio –ilmiöstä aiheutuvien vaurioiden histopatologia on vielä laajalti tuntematon. Tässä työssä selvitetään, voidaanko hapenpuutteen aiheuttamaa vaurioita arvioida histologisesti luotettavasti.

Aineisto ja menetelmät: Tutkimuksessa käytettiin 16 sisäsiittoista Fisher 344-merkkistä rottaa. Kontrollina toimi 4 ei-siirrettyä sydäntä. Rotille tehtiin heterotrooppinen sydänsiirto, jossa luovuttajan sydän siirrettiin vastaanottajan vatsaonteloon. Siirretyt sydämet kärsivät siirron aikana hapenpuutteesta, jota myöhemmässä vaiheessa histologisesti gradeerattiin.

Tulokset: Oikeassa kammiossa havaittiin tilastollisesti merkittävä iskeemisen indeksin nousu hapenpuutteen jälkeen.

Pohdinta: Hapenpuutetta pystytään arvioimaan raportissa kuvaillulla menetelmällä. Oikea kammiio näyttäisi olevan akuutisti hapenpuutteelle herkempi ja tätä patofysiologiaa olisi hyvä jatkossa tutkia enemmän.

Sisällysluettelo

Tausta ja ongelmat	4
Aineisto ja menetelmät.....	6
Tulokset	9
Pohdinta.....	11
Lähteet.....	13

Tausta ja ongelmat

Sydänkirurgiassa käytetään hallittua hapenpuutetta mm. sydänkeuhkokonetta käyttäen. Sydän on kuitenkin hyvin altis hapenpuutteen aiheuttamille vaurioille, kun verenkierto on sydänleikkauksen yhteydessä pysäytetty väliaikaisesti. Toisaalta hapenpuute myötävaikuttaa inflammatorisen reaktion edistymiseen, millä voi olla immunologisia jälkivaikutuksia sydämeen. Patofysiologisilla hapenpuutteen mekanismeilla on pitkäaikaisvaikutuksia sydämen toipumiselle kirurgian jälkeen. Sydämen kärsimän hapenpuutteen ja ns. iskemia-reperfuusiovaurioiden tutkiminen on erittäin haasteellista ilman kokeellista mallia ja näiden vaurioiden histopatologia on vielä laajalti tuntematon. Laboratoriossa havaittavia menetelmiä ja tuloksia on taasen vaikea suoraan soveltaa takaisin klinikkaan ilman histopatologista tietämystä.

Aiemmissa tutkimuksissa sydänlihasiskemian on havaittu heikentävän asteittain kudosperefuusiota ja vasteena tälle aiheuttavan sydämen kokonaisvaltaista uudelleen muokkaantumista (1,2). Iskemian on myös havaittu vapauttavan aineenvaihdunnan sivutuotteita sen jälkeen, kun verenkierto palautetaan alueelle (3). Iskemia-reperfuusiovaurion aiheuttamat histologiset löydökset on todettu löytyvän erityisesti sydänlihaksen sisäisten valtimoiden seinämästä (2). Verenkierron äkillinen palautus aikaansaa toisaalta sydämen äkillisen kuormittumisen ja reperfuusiovaurion. Tämä voi saada aikaan systeemi- ja keuhkoverenkierron äkillisen kuormittumisen ja sydämen äkillisen vajaatoiminnan. Rottamalleissa on havaittu, että sydämen hapenpuutteella on myös kauempana sydämessä havaittavia muutoksia. Muutokset näkyvät etenkin lihaksen sisäisten valtimoseinien turvotuksena. (2,4)

Rotan sydämensiirtomallilla voidaan sydän pysäyttää hallitusti ja jälleen liittää saajaeläimen verenkiertoon. Tampereen Sydänsairaalan tutkimusyksikössä on tutkittu jo usean vuoden ajan sydämen hapenpuutetta rotan koe-eläinmallin avulla (3,5,6). Rottamallillamme voidaan tutkia sydämeen kohdistuvia molekyylimekanismeja sydämen verenkierron palautuksen jälkeen. Tätä menetelmää on pidetty kliinisesti merkittävänä ja

kuvastavan hyvin muutoksia, joita sydänlihas kohtaa kirurgian ja tukoksen takia johtuvan hapenpuutteen aikana (7).

Sydämen kärsimää iskemiavauriota on pyritty hallitsemaan tehokkailla suojauslioksilla, joiden tarkoituksena on pysäyttää sydämen sähköinen ja mekaaninen toiminta. Toiminnan väheneminen johtaa pienempään hapen tarpeeseen ja tämän on tarkoitus hillitä vauriota. Eri liuksilla on todettu jonkin verran eroja tehossa, mutta tutkimusnäyttö tästä ei ole yksiselitteistä (1,5). Iskemia-reperfuusiovauriota on koe-eläinmallissa pystytty hallitsemaan myös hypotermian avulla. Kun sydän pidettiin jäähdytettynä reperfuusion aikana, havaittiin koesydämissä kontrolleja paremmat verenvirtaukset 3 tuntia reperfuusion jälkeen (8). Tutkimuksen tulosten perusteella voidaan epäillä, että hypotermia vähentäisi mikrovaskulaarista reperfuusiovauriota. Lisäksi sydämen siirron aikana siirtosydämen jatkuva plegiaperfuusio saattaa suojata sydäntä ja mahdollistaa paremman toiminnan (9). Vaikkakin rottamallilla tällä saatiin tulosta, tämän menetelmän kliininen merkitys on vielä jäänyt avoimeksi.

Mikrodialyysimenetelmällä voidaan kokemuksemme mukaan todentaa käynnissä olevia prosesseja elimistössä kudoksessa mittaamalla eri aineenvaihdunnan tuotteita. Tällä tavalla on pystytty määrittämään keinoja arvioida käynnissä olevaa iskemiaa sydämessä. Tällä menetelmällä pystytään arvioimaan hyvin varhaisia vaiheita kudostuhoossa ja näillä muutoksilla saattaa olla ennusteellista merkitystä siirrännäissydämen toiminnalle (6). Histopatologisella menetelmällä ei pystytä iskeemistä tuhoa tai verenvuotoa havaitsemaan välittömästi iskemia-reperfuusio vaurion jälkeen. Kuitenkin sydänlihaksen sisäistä turvotusta ja tummatumaisten valtimoseinäsolujen määrän havaittiin lisääntyvän 0,5 tuntia iskemia-reperfuusiovaurion jälkeen (4).

Ihmissydämillä on tehty tutkimuksia, joissa akuutin hapenpuutteen aiheuttamien muutosten määrää on arvioitu laskennallisesti (1,5). Näissä töissä ei kuitenkaan arvioitu sydämen kärsimän hapenpuutteen määrää, vaan gradeerauksella pyrittiin arvioimaan eri liuosten kykyä vähentää vauriota. Tutkimuksissa on saatu ristiriitaisia tuloksia. Tämä johtunee siitä, että toisessa tutkimuksessa arvioitiin, onko vauriota vai ei (5) ja toisessa

vaurion aste gradeerattiin tarkemmin (1). Tutkimuksessa kylläkin havaittiin, että kolmiportainen gradeeraus voisi toimia ihmisillä ennustavana tekijänä siirrännäissydämen vajaatoiminnalle, mutta tämä ei ollut aikaisemmin tutkimuksen päätarkoitus (1).

Tämä syventävien opintojen osuus selvittää kokeellisen sydänlihasiskemian astetta vertaamalla histologista luokitusta sydämen kokonaisvaltaiseen toipumiseen. Tutkimuksessa on tarkoitus selvittää, pystyykö HE-värjätyistä näytteistä arvioimaan valomikroskoopilla sydämen kärsimän hapenpuutteen määrää.

Aineisto ja menetelmät

Tutkimuksessa käytettiin 16 sisäsiirtoista Fischer 344-merkkistä rottaa, joille tehtiin vatsaonteloon heterotrooppinen sydänsiirto mikrokirurgisesti. Kontrolliryhmänä toimivat 4 ei-siirrettyä sydäntä.

Sydänsiirrännäinen altistui hallitulle hapenpuutteelle ennen sen siirtämistä saajaeläimen vatsaontelon verenkiertoon. Sydämen hapentarvetta hallittiin injektoidulla kylmällä Custodiol-liuosta alaonttolaskimoon. Liuoksen tarkoituksena oli pysäyttää sydämen sähköinen ja mekaaninen toiminta, jolloin sydänlihas käyttää mahdollisimman vähän happea ja siten vähentää hapenpuutteesta johtuvan vaurion määrää. Liuoksen injisoimisen jälkeen alaonttolaskimo ja molemmat yläonttolaskimot ommeltiin umpeen, jotta sydämeen ei enää palaisi verta. Laskimoiden sulkemisen jälkeen suljettiin keuhkovaltimorunko ja keuhkolaskimot sekä aortta. Kun kaikki suonet olivat kiinni, irrotettiin sydänsiirre katkaisemalla verisuonet ompeleiden ulkopuolelta. Samalla ylimääräinen keuhkokudos poistettiin siirteestä, jotta vierasta kudosta siirtyisi mahdollisimman vähän. Siirtosydän laitettiin Custodiolia sisältävään astiaan kylmään odottamaan, että vastaanottava rotta on valmiina leikkausta varten. Irrotuksen, odottelun ja replantaation aikana sydänlihas kärsi hapenpuutteen, jota myöhemmässä vaiheessa pyrittiin arvioimaan.

Vastaanottava rotta nukutettiin sevofluraani-kaasulla ja anestesiaa syvennettiin injisoimalla pentobarbitaalia vatsaonteloon painon mukaisesti. Kun rotta nukkui, testattiin kipureaktio painamalla rotan kynttä. Mikäli kipureaktiota ei tullut, todettiin anestesian olevan riittävän syvä ja leikkaus voitiin aloittaa. Leikkauksessa rotan vatsaontelo avattiin keskilinjassa ja suolisto siirrettiin 0.9 % NaCl-liuoksella kastellun rätin sisään suojaan leikkauksen ajaksi. Vatsa-aortta ja alaonttolaskimo preparoitiin esille ja verenkierto suljettiin pihdeillä suunnitellun leikkausalueen ylä- ja alapuolelta. Vatsa-aorttaan viillettiin puukolla noin 4 mm pituinen viilto, johon sydänsiirteen aortta ommeltiin kiinni. Alaonttolaskimoon leikattiin saksilla reikä, johon sydänsiirteen keuhkovaltimorungon tyviosa ommeltiin kiinni. Aorttaan tehtiin pelkkä viilto, koska paineolosuhteet ovat siellä huomattavasti korkeammat kuin laskimopuolella, jossa verenkulun turvaamiseksi on tehtävä suuremmat aukot. Kun suonet olivat ommeltu yhteen, avattiin pihdit ja alueen verenkierto palautui. Tämän jälkeen sydänsiirteeseen tuli hapekasta verta, joka kulki aortasta sepelvaltimoiden ja sinus coronariuksen kautta oikeaan eteiseen ja sieltä keuhkovaltimorungon kautta takaisin vastaanottavan rotan verenkiertoon. Tässä kohtaa sydän kärsi iskemia-reperfuusioaurion, joka on osa vauriota, jota pyrittiin histologisesti arvioimaan.

Yhden päivän jälkeen sydämen siirrosta toimivia sydänsiirrännäisiä verrattiin ei-toimiviin sydänsiirrännäisiin sydänlihaksen pienten valtimoiden osalta histologisen gradeerauksen avulla.

Tampereen yliopiston patologian osastolla näytteistä valmistettiin histologiset parafiinileikkeet. Histologinen morfologia evaluoitiin HE-värijätyistä laseista, joista evaluoitiin erikseen sydämen sekä oikea ja vasen kammio että kammioväliseinämä.

Leikkeistä analysoitiin sydänlihaksen verenvuodot, tulehduksen aste ja hapenpuute. Verenvuodon määrä arvioitiin asteikolla 0-3. Mikäli verenvuotoa ei ollut lainkaan, näyte sai arvon 0 ja mikäli näytteessä sydänlihas oli täynnä verenvuotoa, sai näyte arvon 3. Verenvuodon määrää arvioitiin silmämääräisesti katsomalla sydänlihaskudoksen sisäistä verenvuotoa, kammioissa ja suonissa olevaa verimassaa ei tässä huomioitu.

Tulehduksen astetta arvioitiin asteikolla 0-1. 0 tarkoitti sitä, että tulehdussolukkoa ei löytynyt merkittäviä määriä. 1 tarkoitti sitä, että tulehdussolukkoa löytyi. HE-värjätyissä laseissa pystytään näkemään lymfosyyttisolut ja niitä pidettiin merkinä tulehdusprosessista sydämessä. Makrofagit näkyvät myös HE-värjäyksessä ja se on toinen merkki tulehduksesta.

Erityisesti 40-kertaisella suurennoksella tutkittiin edustavat sydänlihaksen sisäiset valtimosuonet, joissa sydämeen kohdistuneet hapenpuutteen aiheuttamat iskemia-reperfuusioauriot ovat ensisijaisesti todettavissa. Näistä valtimoista analysoitiin sekä keskikerroksessa sijaitsevia hapenpuutteen aiheuttamia tumamuutoksia ja teräväreunaisten tumien määrää että tulehdusmuutoksia ulkokerroksessa. Tumamuutoksiksi laskettiin valtimoseinän solujen tumiin ilmestyneet vakuolit. Tumamuutosten ja teräväreunaisten tumien määrät laskettiin ja tulokset ilmoitettiin erikseen molempien muuttujien osalta. Näistä muuttujista laskettiin iskeeminen indeksi, joka kuvaa sydänlihaksen kärsimän hapenpuutteen tasoa. Tämä indeksi määriteltiin siten, että sydänlihaksen valtimon poikkileikkauksesta yhteen lasketut vakuolisoivat iskeemiset solut ja teräväreunaisten tumien lukumäärä jaettiin pyöreäreunaisten normaalien solujen tumien lukumäärällä. Eri ryhmien hapenpuutetta verrattiin laskettuun iskeemiseen indeksiin.

Leikkeet analysoitiin sokkoutetusti, eli analysoija ei voinut tunnistaa tutkittavaa leikettä. Tällä pyrittiin välttämään tutkijan ennakko-odotusten vaikutusta näytteiden tulkinnessa.

Tilastanalyysit tehtiin SPSS-ohjelmistolla vertaamalla hapenpuutteelle altistuneita sydänsiirrännäisiä ei-leikattuihin sydämiin käyttäen non-parametrista Mann-Whitney testiä.

Tulokset

Vasemman kammion, oikean kammion ja sydämen väliseinän iskeeminen indeksi oli:

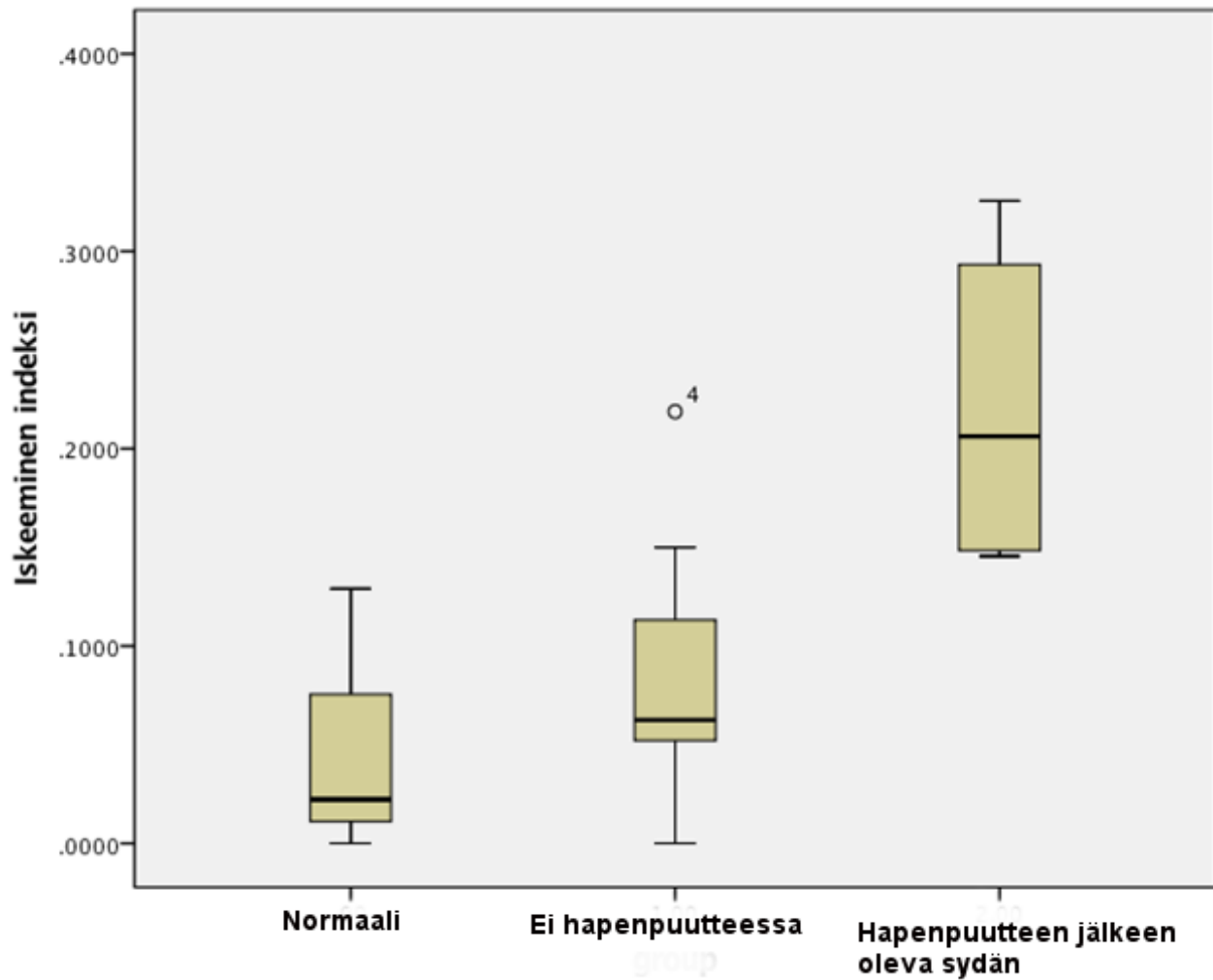
Taulukko 1. Sydämen eri osien iskeemiset indeksit				
Ryhmä		vasen	oikea	väliseinä
Normaali	Keskiarvo	0.192	0.0504	0.0692
	N	3	3	2
	Keskihajonta	0.268	0.0690	0.0234
Ei-hapenpuutuksessa oleva sydän	Keskiarvo	0.0925	0.0868	0.122
	N	11	11	10
	Keskihajonta	0.0414	0.0600	0.0854
Hapenpuutteen jälkeen oleva sydän	Keskiarvo	0.259	0.221	0.187
	N	4	4	4
	Keskihajonta	0.0999	0.0877	0.0786
Yhteensä	Keskiarvo	0.146	0.111	0.132
	N	18	18	16
	Keskihajonta	0.128	0.0889	0.0840

Vasen kammio, $p= 0.051$

Oikea kammio, $p= 0.021$

Sydämen väliseinä, $p= 0.212$

Oikean kammion pienten valtimoiden iskeeminen indeksi tutkittavien ryhmien välillä:



Kuva 1. Iskeeminen indeksi oikean kammion eri ryhmien välillä

Pohdinta

Sydänlihaksen pienten valtimoiden iskeeminen indeksi kuvaa koko sydänsiirännäisen hapenpuutteen astetta. Tämän indeksin mukaan oikean kammion iskeeminen indeksi on herkkä sydänlihaksen statuksen arvioimisessa. Sydämen oikean puoli on erityisen herkkä reagoimaan sydämen hapenpuutteeseen myös funktionaalisesti.

Tällä mallilla on pystytty osoittamaan, että jo vuorokauden kohdalla pystytään histologisesti havaitsemaan merkittäviä muutoksia sydänlihaksessa. Nämä muutokset saattavat myöhemmässä vaiheessa aiheuttaa kliinisesti havaittavaa oikean kammion vajaatoimintaa. Tätä lopputulosta ei tässä tutkimuksessa kylläkään tutkittu. Tämän tutkimuksen tulokset tukevat aiempien tutkimusten löydöksiä sen suhteen, että iskemiaa pystytään histologisesti gradeeraamaan ja sen kautta voidaan arvioida sydänlihaksen kärsimän hapenpuutteen määrää.

Aikaisemminkin on jo todettu, että hapenpuute sydämessä voi aiheuttaa oikean kammion vajaatoimintaa ilman vasemman kammion vajaatoimintaa (10). Meidän tutkimuksemme tukee tätä löydöstä, koska oikea kammio vaikuttaa olevan vasempaa kammiota herkempi hapenpuutteelle. Patofysiologia oikean kammion vajaatoiminnassa on vielä huonosti tunnettu ja sitä on vain vähän tutkittu. Kuitenkin viime aikoina asiaan on alettu kiinnittämään enemmän huomiota, kun on havaittu, että oikean kammion infarkti on mukana 14-60 % sydäninfarktiin kuolleissa (10,11).

Akuutissa iskemiassa oikean kammion hapenpuute voi aiheuttaa verenkierröllisen shokin ja hemodynamiikan romahtamisen. Oikea kammio kuitenkin vaikuttaa olevan vasenta kammiota parempi paranemaan akuutin vaiheen jälkeen. Mikäli reperfuusio on tehty alle tunnissa iskemian alusta, palautuminen on välitöntä. Kahdeksan tunnin sisällä tehdyn

reperfuusion jälkeen oikea kammio vielä paranee, mutta huomattavasti hitaammin. Tätä hitaampi reperfuusio aiheuttaa jo merkittävää sairaalakuolleisuutta (10).

Kokeellisella mallilla on tutkittu, miten puhdas oikean kammion iskemia vaikuttaa sydämen toimintaan. Tutkimuksessa havaittiin, että sydämen minuuttitilavuus vähenee noin 20 % (11). Sydämen oikea puoli kuitenkin pystyy vielä toimimaan väliseinän liikkeen avulla (10,11). Kliinisesti puhdas oikean kammion iskemia on kuitenkin harvinainen, koska koko kammioseinän infarkti vaatisi usein oikean sepelvaltimon tyven tukoksen. Tällaisen tukoksen seurauksena yleensä myös väliseinä ja vasemman kammion takaosa vaurioituvat. Oikean kammion vajaatoimintaa on kuitenkin tärkeää tutkia, koska näyttöä mistään tehokkaasta hoidosta ei vielä ole (12). Ongelmana on juuri tapausten harvinaisuus. Yleensä oikean kammion vajaatoiminta liittyy muun muassa vasemman kammion vajaatoimintaan, keuhkoemboliaan, sepsikseen tai muihin vakaviin tiloihin ja tällöin hoito on myös keskittynyt näiden syiden hoitoon (10,11,12).

Histologinen hapenpuutteen asteen luokittelu edesauttaa sydänlihasiskemian vaurion asteen arvioinnissa. Tällä syventävien opintojen osiolla pyritään luomaan perusedellytyksiä tarkempiin analyysihin tulevilla kokeellisilla tutkimuksilla Tampereella. Tarkoituksena on histologisesti arvioida sydänlihasiskemian toipumisen ennuste, jolloin iskemiaan vaikuttavien interventioiden vaikutus pystytään tehokkaammin jatkossa määrittämään.

Tutkimuksen rajoitteena on pieni näytteiden määrä, joka saattaa lisätä harhan osuutta tuloksissa. Aikaisemmissakin tutkimuksissa on havaittu iskemian näkyvän ensimmäisenä väliseinän ja oikean kammion alueella, joten tulokset ovat samansuuntaisia näiden kanssa (2,5,6).

Lähteet

1. George TJ et al. A novel method of measuring cardiac preservation injury demonstrates University of Wisconsin solution is associated with less ischemic necrosis than Celcior in early allograft biopsy specimens. *J Heart Lung Transplant*. 2012 Apr;31(4):410-8
2. Lin PJ et al. Acute endothelial reperfusion injury after coronary artery bypass grafting. *Annals of Thoracic Surgery*. 58(3):782-8, 1994 Sep
3. Wang Z et al. Confined ischemia may improve remote myocardial outcome after rat cardiac arrest. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014 Jan;74(1):27-36
4. Vuohelainen et al. Myocardial infarction induces early increased remote ADAM8 expression of rat hearts after cardiac arrest. *Scandinavian Journal of Clin & Lab Invest*. 71(7):553-62, 2011 Nov.
5. Esposito S et al. Determinants and prognostic value of ischemic necrosis in early biopsies following heart transplant. *Heart Vessels*. 2000; 15(4):167–171
6. Liu Z et al. Glutamate release predicts ongoing myocardial ischemia of rat hearts. *Scand J Clin Lab Invest* 2010 ; 70 : 217 – 24
7. Suzuki K et al. Development of an in vivo ischemia-reperfusion model in heterotopically transplanted rat hearts. *Transplantation*. 73(9):1398-402, 2002 May 15.
8. Hale SL et al. Hypothermia during reperfusion limits 'no-reflow' injury in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research*. 59(3):715-22, 2003 Sep 1.
9. Nickless DK et al. Continuous perfusion improves preservation of donor rat hearts: importance of the implantation phase. *Annals of Thoracic Surgery*. 65(5):1265-72, 1998 May.
10. Kakouros N et al. Right ventricular myocardial infarction: pathophysiology, diagnosis, and management. *Postgrad Med J* 2010;86:719–28
11. Haraldsen P et al. A porcine model for acute ischaemic right ventricular dysfunction. *Interactive Cardiovascular & Thoracic Surgery*. 18(1):43-8, 2014 Jan.
12. Lahm T, McCaslin CA, Wozniak TC, Ghumman W, Fadl YY, Obeidat OS et al. Medical and surgical treatment of acute right ventricular failure. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:1435–46.